

PCT

WELTORGANISATION FÜR  
InternationaleINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/67734
A61K 31/00			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. November 2000 (16.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03967		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2000 (03.05.00)			
(30) Prioritätsdaten: 199 21 567.7 11. Mai 1999 (11.05.99) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht	
(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBISCH, Wilfried [DE/DE]; Häuserstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). SADOWSKI, Jens [DE/DE]; Mainstrasse 2, D-67117 Limburgerhof (DE). KOCK, Michael [DE/DE]; Lillengasse 80, D-67105 Schifferstadt (DE). HÖGER, Thomas [DE/DE]; Rathenaustrasse 12, D-68535 Edingen-Neckarhausen (DE).		Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
<p>(54) Title: USE OF PHTHALAZINE DERIVATIVES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PHTHALAZINE-DERIVATEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of phthalazine derivatives as inhibitors of the enzyme poly(ADP-ribose)polymerase or PARP (EC 2.4.2.30), and to their use as inhibitors of PARP-homologous enzymes. These phthalazine derivatives also exhibit, in particular, a selective inhibition of the PARP-homologous enzymes.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phthalazin-Derivaten als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30), die Verwendung als Inhibitoren von PARP-homologen Enzymen und insbesondere zeigen diese Phthalazin-Derivate auch eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verwendung von Phthalazine-Derivaten

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phthalazin-Derivaten als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30), die Verwendung als Inhibitoren von PARP-homologen Enzymen und insbesondere zeigen diese Phthalazin-  
10 Derivate auch eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme.

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS) stellt ein regulatorisches Enzym dar, das in Zellkernen gefunden wird (K. Ikai et al.,

15 *J. Histochem. Cytochem.* 1983, 31, 1261-1264). Man nimmt an, daß PARP eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Brüchen spielt (M.S. Satoh et al., *Nature* 1992, 356, 356-358). Schädigungen oder Brüche der DNA-Stränge aktivieren das Enzym PARP, das, wenn es aktiviert ist, die Übertragung von ADP-Ribose aus NAD katalysiert  
20 (S. Shaw, *Adv. Radiat. Biol.*, 1984, 11, 1-69). Dabei wird Nikotinamid aus NAD freigesetzt. Nikotinamid wird unter Verbrauch des Energieträgers ATP von anderen Enzymen wieder in NAD umgewandelt. Eine Überaktivierung von PARP hätte dementsprechend einen unphysiologisch hohen Verbrauch von ATP zur Folge und dies  
25 führt im Extremfall zu Zellschädigungen und Zelltod.

Es ist bekannt, daß Radikale wie Superoxid-Anion, NO und Wasserstoffperoxid in Zellen zu DNA-Schädigungen führen können und damit PARP aktivieren. Die Bildung von großen Mengen an Radikalen  
30 wird bei einer Reihe von pathophysiologischen Zuständen beobachtet und man geht davon aus, daß diese Anhäufung von Radikalen zu den beobachteten Zell- bzw. Organschäden führen oder beitragen. Dazu zählt von zum Beispiel ischämische Zustände von Organen wie im Schlaganfall, Herzinfarkt (C. Thiemermann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 679-683) oder Ischämie der Nieren, aber auch Reperfusionsschäden wie sie zum Beispiel nach der Lyse von Herzinfarkt auftreten (s. oben: C. Thiemermann et al.). Die Hemmung von dem Enzym PARP könnte demzufolge ein Mittel sein, um diese Schäden zum mindestens zum Teil zu verhindern oder abzumildern. PARP-Inhibitoren könnten somit ein neues Therapieprinzip zur Behandlung von einer Reihe von Krankheiten darstellen.

Das Enzym PARP beeinflußt die Reparatur von DNA-Schäden und könnte somit auch in der Therapie von Krebs-Erkrankungen eine  
45 Rolle spielen, da in Kombination mit cytostatisch wirksamen Stoffen ein höheres Wirkpotential gegenüber Tumorgewebe beob-

achtet wurde (G. Chen et al. *Cancer Chemo. Pharmacol.* 1988, 22, 303).

Zudem wurde gefunden, daß PARP-Inhibitoren immunsuppressive 5 Wirkung zeigen können (D. Weltin et al. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995, 17, 265-271).

Es wurde ebenfalls entdeckt, daß PARP bei immunologischen Erkrankungen bzw. Krankheiten, in denen das Immunsystem eine 10 wichtige Rolle spielt, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis und septischer Schock, involviert ist, und daß PARP-Inhibitoren einen günstigen Effekt auf den Krankheitsverlauf zeigen können (H. Kröger et al. *Inflammation* 1996, 20, 203-215; W. Ehrlich et al. *Rheumatol. Int.* 1995, 15, 171-172; C. Szabo et al., *Proc. 15 Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3867-3872; S. Cuzzocrea et al. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 342, 67-76).

Weiterhin zeigte der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid protektive Effekte in einem Model für den Kreislaufschock (S. Cuzzocrea 20 et al., *Br. J. Pharmacol.* 1997, 121, 1065-1074).

Ebenfalls gibt es experimentelle Hinweise, das Inhibitoren des Enzyms PARP als Mittel zur Behandlung von Diabetes mellitus nützlich sein könnten (V. Burkart et al. *Nature Med.* 1999, 5, 25 314-319).

Phthalazine und deren Derivate stellen eine vielbenutzte Stoffklasse dar. 2H-Phthalazin-1-one, die zudem in 4-Stellung Substituenten tragen, sind jedoch bisher weniger beschrieben worden. 30 So sind Methylenamide, Methylenharnstoffe und Methylenimide in Puodzhyunas et al. *Pharm. Chem. J.* 1973, 7, 566; W. Mazkanowa et al., *Zh. Obshch. Khim.* 1958, 28, 2822 und in F.K. Mohamed et al., *Ind. J. Chem. B*, 1994, 33, 769 dargestellt worden. Zyklische Amine und Alkylamine, wobei die Aminogruppe sowohl 35 eine zyklische als auch ein aliphatisches Amin sein kann, sind in J. Singh et al., *Ind. J. Chem. B*, 1983, 22, 1083, Y. Egushi et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 9, 1846 und in Iyo Kizai *Kenkyusho Hokoku*, 1998, 12, 41 (CA 91, 91579) beschrieben worden, wobei allerdings die Verbindungen auf antiatherosklerotische 40 Wirkung, auf Hemmung der Blutplättchenaggregation oder auf Blutdrucksenkung untersucht wurden. In WO 99/11649 sind in Phthalazinone erwähnt, die in 4-Stellung Phenylpiperazinylmethyl-Reste tragen und die als Inhibitoren des Enzyms PARP beschrieben wurden.

In A.M. Bernard et al., Synthesis 1998, 317 sind 2H-Phthalazin-  
one, in 4-Stellung Phenoxyethyl-Derivate tragen, hergestellt  
worden.

5 In der vorliegenden Erfindung werden neue Phthalazin-Derivate  
der allgemeinen Formeln I beschrieben, die überraschenderweise  
PARP-Inhibitoren darstellen.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, daß diese Verbindungen  
10 der allgemeinen Formel I auch PARP-homologe Enzyme hemmen. Zudem  
zeigen diese Verbindungen überraschenderweise eine selektive  
Hemmung der PARP-homologen Enzyme d.h. die Verbindungen hemmen  
die homologen Enzyme stärker als das Enzym PARP selbst.

15 Die erfindungsgemäßen Phthalazine weisen gegenüber PARP-Homologen  
(PARP 2) eine bevorzugt 5-fach stärkere inhibitorische Wirkung  
auf als gegenüber dem bekannten PARP (PARP 1).

Unter PARP-Homologen wird insbesondere das Homologe PARP-2 gemäß  
20 WO 99/64572 (human PARP2) verstanden. Dies läßt sich vorteil-  
hafterweise aus dem menschlichen Hirn, Herz, Skelettmuskel, Niere  
und Leber isolieren. In anderen Geweben oder Organen ist human-  
PARP2 deutlich schwächer exprimiert.

25 Insbesondere das aus menschlichem Hirn isolierbare humanPARP2 und  
dessen funktionale Äquivalente sind bevorzugte Agenzien für die  
Entwicklung von Inhibitoren gegen Schlaganfall. Es kann nämlich  
angenommen werden, daß die Wirkstoffentwicklung, basierend auf  
PARP2 als Indikator, die Entwicklung von Inhibitoren ermöglicht,  
30 welche für die Anwendung an menschlichem Gehirn optimiert sind.  
Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auf Basis von PARP2 ent-  
wickelte Inhibitoren auch zur Therapierung PARP-vermittelter  
pathologischer Zustände anderer Organe einsetzbar sind. Anhand  
der Gewebeverteilung der erfindungsgemäßen Proteine sind vor  
35 allem Indikationen von Interesse, die auf ischämischen Zuständen  
entsprechender Organe beruhen (Ischämie der Hirns (Schlaganfall),  
der Herzens (Herzinfarkt), Schädigungen, die während oder nach  
der Infarktlyse (z.B. mit TPA, Reteplase oder mechanisch mit  
Laser oder Rotoblator) und von Mikroinfarkten während und nach  
40 Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantatio-  
nen, der Niere (akuten Nierenversagen, akute Niereninsuffizienz  
oder Schädigungen während und nach einer Nierentransplantation),  
Schädigung der Leber oder der Skelettmuskulatur). Ferner sind  
Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Erkrankungen  
45 denkbar, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirn-Trauma), Massen-  
blutung, Subarachnoidal-Blutungen und Schlaganfall auftreten,  
sowie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie multipler Infarkt-

Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie z.B. Petit mal, und tonisch-clonischen Anfällen und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lobe, und komplex-  
5 partiellen Anfällen. Ferner können besagte Proteine relevant sein bei der Behandlung einer Revaskularisation kritisch verengter Koronararterien und kritisch verengter peripherer Arterien, z.B. Beinarterien. Darüber hinaus können besagte Proteine eine Rolle spielen bei der Chemotherapie von Tumoren und bei der Ver-  
10 hinderung von Metastasierungen sowie bei der Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, z.B. der rheumatischen Arthritis. Weitere pathologische Zustände dieser und anderer Organe sind denkbar.

15 Ähnlich wie PARP1 wird auch PARP2 durch geschädigte DNA, wenn auch durch einen vermutlich anderen Mechanismus aktiviert. Eine Bedeutung in der DNA-Reparatur ist denkbar. Die Blockade der erfindungsgemäßen PARPs würde auch in Indikationen, wie Krebs, von Nutzen sein (z.B. in der Radiosensitisierung von Tumopatien-  
20 ten).

Unter Verwendung der oben beschriebenen spezifischen Assay-Systeme für Bindungspartner von PARP1 und PARP2 wurden aktive und selektive Inhibitoren gegen die erfindungsgemäßen Proteine  
25 entwickelt.

Erfindungsgemäß bereitgestellte Inhibitoren besitzt gegenüber PARP2 eine stark ausgeprägte inhibitorische Aktivität. Die  $K_i$ -Werte können dabei weniger als etwa 1000 nM, wie z.B. weniger  
30 als etwa 700 nM, weniger als etwa 100 nM und weniger als etwa 30 nM, wie z.B. etwa 1 bis 20 nM, betragen.

Erfindungsgemäß bevorzugte Inhibitoren besitzen eine überraschend ausgeprägte Selektivität für PARP2. Das Verhältnis  $K_i$ (PARP1):  
35  $K_i$ (PARP2) für erfindungsgemäße Inhibitoren ist nämlich z.B. größer als 5. Eine weitere Gruppe von Inhibitoren wurde so entwickelt, daß sie PARP1 und PARP2 gleichzeitig inhibieren.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur  
40 Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch  
45 alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Trans-

posons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

### 5 Expression der Konstrukte

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebbracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate oder des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z.B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z.B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen  $\lambda$ ,  $\mu$  oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bilden ein Expressionssystem. Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme beispielsweise die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA zu programmieren.

Herstellung von Antikörpern:

Die Herstellung von Anti-PARP2-Antikörpern erfolgt in einer dem 10 Fachmann geläufigen Weise. Mit Antikörpern sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, ebenso wie Antikörperfragmente, wie Fv, Fab und (Fab)'<sub>2</sub>. Geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. 15 beschrieben in Campbell, A.M., Monoclonal Antibody Technology, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Dübel, S., Rekombinante Antikörper (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

20 Beispiel A: Isolierung der PARP2-cDNA

Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, # HL3002a, Fa. Clontech) wurden die vorliegenden cDNA-Sequenzen 25 erstmalig gefunden. Die Sequenz dieses Klons ist in SEQ ID NO:1 beschrieben.

Beispiel B: Herstellung der Enzyme

30 Humanes PARP1 wurde zum Vergleich rekombinant im Baculovirus-System in der dem Fachmann geläufigen Weise exprimiert und wie beschrieben (Shah et al., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13) partiell aufgereinigt. Rinder PARP1 in einer 30-50%igen Reinheit (c = 0,22 mg/ml, spez. Aktivität 170 nmol ADP-ribose/ 35 min/mg Gesamtprotein bei 25°C) wurde von BIOMOL (Best.-Nr. SE-165) bezogen. Humanes PARP2 wurden rekombinant im Baculovirus-System (Bac-to-Bac System, BRL LifeScience) exprimiert. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs in den pFASTBAC-1-Vektor kloniert. Nach Herstellung von rekombinanter Baculovirus-DNA durch Rekombination in 40 E. coli, erfolgte Transfektion von Insektenzellen (Sf9 oder High-Five) mit den entsprechenden rekombinanten Baculovirus-DNAs. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Virenstämme wurden in der dem Fachmann geläufigen Weise amplifiziert. Größere Mengen rekombinanter 45 Proteine wurden durch Infektion von 500 ml Insektenzellkultur (2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) mit Viren in einer MOI (multiplicity of infection; Verhältnis von Viren zu Zellen) von 5-10 infiziert

und 3 bis 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Proteine aus dem Pellet aufgereinigt.

5 Die Aufreinigung erfolgte durch klassische, dem Fachmann geläufige Methoden der Proteinreinigung unter Detektion der Enzyme mit entsprechenden spezifischen Antikörpern. Teilweise wurden die Proteine auch über eine 3-Aminobenzamid/Affinitäts-  
säule wie beschrieben (Burtscher et al., Anal Biochem 1986,  
10 152:285-290) affinitätsgereinigt. Die Reinheit betrug >90%.

Beispiel C: Testsysteme für die Bestimmung der von Aktivität von PARP2 und der Inhibitorischen Wirkung von Effektoren auf PARP1 und PARP2

15

a) Herstellung von Antikörpern gegen Poly-(ADP-ribose)

Als Antigen zur Generierung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern kann Poly-(ADP-ribose) verwendet werden. Die Herstellung 20 von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern ist in der Literatur beschrieben. (Kanai Y et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306; Kawamaitsu H et al. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) Immunology 34, 501-508).

25 Unter anderem wurden verwendet: Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (polyklonales Antiserum, Kaninchen), BIOMOL; Best.-Nr. SA-276. Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (monoklonal, Maus; Klon 10H; Hybri-omaüberstand, affinitätsgereinigt).

30 Die Antiseren oder aus Hybridomakulturüberstand gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden durch eine Protein-A-Affinitätschromatographie in der dem Fachmann geläufigen Weise aufgereinigt.

35 b) ELISA-Assay

Materialien:

ELISA Farbreagenz: TMB-Fertigmix SIGMA T-8540

40 Eine 96-well Mikrotiterplatte (FALCON Micro-Test IIIä Flexible Assay Plate, # 3912) wurde mit Histonen (SIGMA, H-7755) beschichtet. Histone wurden hierfür in Carbonatpuffer (0.05M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>; pH 9.4) in einer Konzentration von 50 µg/ml gelöst. Die einzelnen 45 Wells der Mikrotiterplatte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit je 150 µl dieser Histon-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Wells durch Zugabe von

150  $\mu$ l einer 1%igen BSA-Lösung (SIGMA, A-7888) in Carbonatpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgen drei Waschschrifte mit Waschpuffer (0,05% Tween10 in 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline; Gibco, Best.-Nr. 10010): 0,21 g/l 5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9 g/l NaCl, 0,726 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4). Wasch-schrifte wurden durchweg mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt (Mikrotiterplatten-Wäscher "Columbus", SLT-Lab-instruments, Österreich).

10 Für die Enzymreaktion wurden eine Enzymreaktionslösung und eine Substratlösung jeweils als "Pre-Mix" benötigt. Die absolute Menge dieser Lösungen richtete sich nach der Anzahl der vorgesehenen Test-Wellen.

15 Zusammensetzung der Enzymreaktionslösung pro Well:

- 4  $\mu$ l PARP-Reaktionspuffer (1M Tris-HCl pH 8,0, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT)
- 20 ng PARP1 (human oder bovin) oder 8 ng PARP2 (Human)
- 4  $\mu$ l aktivierte DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)

20 - ad 40  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$

Zusammensetzung der Substrat-Lösung pro Well:

- 5  $\mu$ l PARP-Reaktionspuffer (10x)
- 0,8  $\mu$ l NAD-Lösung (10 mM, SIGMA N-1511)

25 - 44  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$

Inhibitoren wurden in 1x PARP-Reaktionspuffer gelöst. DMSO, daß gelegentlich zum Lösen von Inhibitoren in höheren Konzentrationen verwendet wurde, war bis zu einer Endkonzentration von 2 %

30 unproblematisch. Für die Enzymreaktion wurden 40  $\mu$ l der Enzymreaktionslösung pro Well vorgelegt und mit 10  $\mu$ l Inhibitor-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l Substrat-Lösung pro Well gestartet. Die Reaktion wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und 35 anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer gestoppt.

Als primäre Antikörper wurden spezifische Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Antikörper-Puffer (1 % BSA in PBS; 0,05 % Tween20).

40 Die Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente, Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim,

45 Best.-Nr. 1500.686; Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA, Best.-Nr. A-6154) in einer 1:10000 Verdünnung in Antikörperpuffer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die

Farbreaktion unter Verwendung von 100  $\mu$ l Farbreagenz (TMB-Fertig-mix, SIGMA) pro Well für ca. 15 min. bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l 2M  $H_2SO_4$  gestoppt. Danach wurde sofort im ELISA-Platten-Lesegerät ("Easy Reader"

5 EAR340AT, SLT-LabInstruments, Österreich) gemessen (450nm gegen 620nm). Das Messprinzip ist schematisch in Figur 6 dargestellt.

Für die Ermittlung des  $K_i$ -Wertes eines Inhibitors wurden verschiedene Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-  
10 kurve herangezogen. Für eine bestimmte Inhibitorkonzentration werden 3fach-Werte erhoben. Arithmetische Mittelwerte werden mit Microsoft© Excel ermittelt. Die  $IC_{50}$ -Bestimmung erfolgt mit der Microcal© Origin Software (Vers. 5.0) ("Sigmoidal Fit"). Um-rechnung der so berechneten  $IC_{50}$ -Werte auf  $K_i$ -Werte erfolgte durch  
15 Verwendung von "Eich-Inhibitoren". Die "Eich-Inhibitoren" wurden bei jeder Analyse mitgemessen. Der  $K_i$ -Werte der "Eich-Inhibitoren" wurde im gleichen Testsystem durch Dixon-Diagramm Analyse in der dem Fachmann geläufigen Weise ermittelt.

20 c) HTRF-(Homogenous time-resolved fluorescence) Assay

Beim erfindungsgemäßen HTFR-PARP-Assay werden Histone als Zielproteine der Modifikation durch PARP indirekt mit einem XL665-Fluorophor markiert. Der Antikörper wird direkt mit einem  
25 Europium-Kryptat markiert. Befindet sich das XL665-Fluorophor in einer unmittelbaren räumlichen Nähe, die durch eine Bindung an die Poly-(ADP-ribose) am Histon gewährleistet wird, dann ist eine Energieübertragung möglich. Die Emission bei 665 nm ist somit direkt proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper, der  
30 wiederum der Poly-(ADP-ribose) Menge entspricht. Somit entspricht das gemessene Signal der PARP Aktivität. Das Meßprinzip ist schematisch in Figur 7 dargestellt. Die verwendeten Materialien sind, wenn nicht ausdrücklich angegeben, identisch mit denen im ELISA Assay (s.o.) verwendeten.

35 Histone wurden in Hepes-Puffer (50 mM, pH = 7,5) zu 3 mg/ml gelöst. Biotinylierung erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, #21335T). Ein molares Verhältnis von 4 Biotin pro Histon wurde verwendet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten (RT). Anschlie-  
40 ßend wurden die biotinylierten Histone über eine G25 SF HR10/10 Säule (Pharmacia, 17-0591-01) in Hepes Puffer (50 mM, pH = 7,0) aufgereinigt, um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper wurde mittels bifunktionaler Kopplungsreagenzien mit Europium-Kryptat markiert  
45 (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622). Die Reinigung erfolgte auf einer G25SF HR10/30 Säule. Ein molares Verhältnis von 3.1 Kryptaten pro Antikörper wurde

10

erzielt. Die Ausbeute betrug 25 %. Die Konjugate wurden in Gegenwart von 0,1 % BSA in Phosphatpuffer (0,1 M, pH = 7) bei -80°C gelagert.

5 Für die Enzymreaktion wurden pro Well zusammenpipettiert:

- 10 µl PARP-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) mit 20 ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human)
- 10 µl aktivierte DNA in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50 µg/ml)

10 - 10 µl biotinylierte Histone in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (1,25 µM)

- 10 µl Inhibitor in PARP-HTRF-Reaktionspuffer

Diese Reagenzien wurden 2 Minuten vorinkubiert, bevor die

15 Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl NAD-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (400 µM/ml) gestartet wurde. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

20 Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl PARP-Inhibitor (25 µM,  $K_i=10\text{nM}$ ) in "Revelation"-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2M KF, 0,05 % BSA) gestoppt.

25 Danach wurden zugegeben:

- 10 µl EDTA-Lösung (SIGMA, E-7889, 0,5M in H<sub>2</sub>O)
- 100 µl Sa-XL665 (Packard Instruments) in "Revelation"-Puffer (15-31,25nM)

30 - 50 µl Anti-PARP-Kryptat in "Revelation"-Puffer (1,6-3,3nM).

Nach 30 Minuten (bis 4 Stunden) konnte dann gemessen werden. Die Messung erfolgte auf einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments). Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte wie 35 beim ELISA Assay beschrieben.

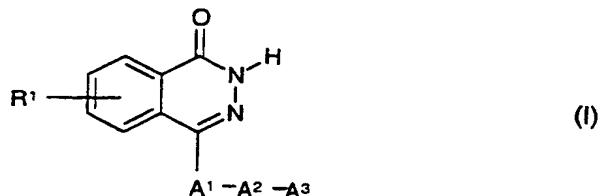
40

45

## 11

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von substituierten Phthalazine der allgemeinen Formel I

5



10 worin

R<sup>1</sup> Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, OH, Nitro, CF<sub>3</sub>, CN, NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, NH-CO-R<sup>13</sup>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, wobei R<sup>11</sup> und R<sup>12</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl bedeuten und R<sup>13</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl oder Phenyl bedeuten, und

15 A<sup>1</sup> einen geradkettigen oder verzweigten C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest und

20 A<sup>2</sup> NR<sup>2</sup>, NR<sup>2</sup>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, O und S und

R<sup>2</sup> Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl und

25 A<sup>3</sup> einen aromatischen oder heteroaromatischen ein oder zweigliedrigen Ring mit je 5 oder 6 Ringatomen und bis zu 3 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O, S, wie zum Beispiel Phenyl, Thiophen, Pyridin, Pyrimidin, Naphthalin, Indol, Imidazol, die noch mit R<sup>4</sup> und einem oder zwei R<sup>3</sup> substituiert sein können, wobei R<sup>3</sup> Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, OH, Nitro, CF<sub>3</sub>, CN, NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, SO<sub>2</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, SO<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, S-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, O-Ph, O-CF<sub>3</sub>, NH-CO-R<sup>13</sup>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, wobei R<sup>11</sup> und R<sup>12</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl bedeuten und R<sup>13</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl oder Phenyl bedeuten kann,

30 R<sup>4</sup> Wasserstoff, (X)<sub>0,1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-NR<sup>41</sup>R<sup>42</sup>, wobei X = O, S und NR<sup>43</sup> und R<sup>41</sup> und R<sup>42</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl und ein cyclisches Amin von 3 bis 7 Gliedern sein kann und R<sup>43</sup> Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sein kann,

35 sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, und deren Prodrugs.

40 45

## 12

Die Verbindungen der Formel I können als Racemate, als enantiomerenreine Verbindungen oder als Diastereomere eingesetzt werden. Werden enantiomerereine Verbindungen gewünscht, kann man diese beispielweise dadurch erhalten, daß man mit einer geeigneten 5 optisch aktiven Base oder Säure eine klassische Racematspaltung mit den Verbindungen der Formel I oder ihren Zwischenprodukten durchführt.

Gegenstand der Erfindung sind auch zu Verbindungen der Formel I 10 mesomere oder tautomere Verbindungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die physiologisch verträglichen Salze der Verbindungen I, die sich durch Umsatz von Verbindungen I mit einer geeigneten Säure oder Base erhalten 15 lassen. Geeignete Säuren und Basen sind zum Beispiel in Fortschritte der Arzneimittelforschung, 1966, Birkhäuser Verlag, Bd. 10, S. 224-285, aufgelistet. Dazu zählen zum Beispiel Salzsäure, Citronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure usw. bzw. Natriumhydroxid, Lithiumhydroxid, Kaliumhydroxid und Tris.

Unter Prodrugs werden solche Verbindungen verstanden, die *in vivo* in Verbindungen der allgemeinen Formel I metabolisiert werden. 25 Typische Prodrugs sind Phosphate, Carbamate von Aminosäuren, Ester und andere.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Phthalazin-Derivate I kann auf verschiedenen Wegen, die in der Literatur bereits durchgeführt 30 wurden, erfolgen.

Die möglichen Synthesemethoden sind zum Beispiel in Puodzhyunas et al. Pharm. Chem. J. 1973, 7, 566, W. Mazkanowa et al., Zh. Obshch. Khim. 1958, 28, 2822, F.K. Mohamed et al., Ind. J. 35 Chem. B, 1994, 33, 769, J. Singh et al., Ind. J. Chem. B, 1983, 22, 1083, Y. Egushi et al., Chem Pharm. Bull. 1991, 9, 1846 und in Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku, 1998, 12, 41 (CA 91, 91579) beschrieben oder dort zitiert worden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können analog der dort beschriebenen Methoden 40 hergestellt werden.

Die in der vorliegenden Erfindung enthaltenen substituierten Phthalazine I stellen Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)-polymerase dar und zeigen insbesondere Selektivität für neue 45 PARP-homologe Enzyme.

Die inhibitorische Wirkung der substituierten Phthalazin-Derivate I wurde mit einem in der Literatur bereits bekannten Enzymtest ermittelt, wobei als Wirkmaßstab ein  $K_i$ -Wert ermittelt wurde. Die Phthalazin-Derivate I wurden in dieser Weise auf 5 Hemmwirkung des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30) gemessen.

Das 4-(4-Phenylpiperazin-1-yl)methyl-2H-phthalazin-1-on wurde in WO 99/11649 als PARP-Inhibitor beschrieben und ist den 10 erfindungsgemäßen Verbindungen strukturell verwandt. Diese Verbindung wurde im angegebenen HTRF-Assay auf die Hemmwirkung von PARP 1 untersucht. Dabei zeigte diese Verbindung jedoch nur schwache Wirkung (bei 10  $\mu\text{M}$  38 % Hemmung).

15 Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht nur auch PARP-Enzyme hemmen, sondern deutlich wirksamer sind (siehe Tabelle).

	Bsp.	PARP1 $K_i/\mu\text{M}$
20	1	0,62
	4	0,19
	11	1,80
25	16	0,78
	17	0,74
	18	0,69

Die substituierten Phthalazin-Derivate der allgemeinen Formeln I 30 stellen Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) bzw. wie es auch genannt wird Poly(ADP-ribose)synthase (PARS) dar und können somit zur Behandlung und Prophylaxe von Krankheiten, die mit einer erhöhten Enzymaktivität dieser Enzyme verbunden sind, dienen.

35 Die Verbindungen der Formeln I können zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen nach Ischämien und zur Prophylaxe bei erwarteten Ischämien verschiedener Organe eingesetzt werden.

40 Die vorliegenden Phthalazin-Derivate der allgemeinen Formel I können danach zur Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Krankheiten, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirntrauma), Massenblutungen, Subarachnoidal-Blutungen und Stroke auftreten, 45 und von neurodegenerativen Krankheiten wie multipler Infarkt-Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen

## 14

Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische Anfälle und partiell epileptischen Anfällen, wie Temporal Lobe, und komplex-partiellen Anfällen, und weiterhin zur Behandlung und Prophylaxe von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien 5 und Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien, zum Beispiel der akuten Niereninsuffizienz, des akuten Nierenversagens oder von Schädigungen, die während und nach einer Nierentransplantation auftreten, dienen. Weiterhin können die Verbindungen der allgemeinen Formeln I zur Behandlung des akuten Myocardinfarkts und Schädigungen, die während und nach dessen medikamentöser Lyse auftreten (zum Beispiel mit TPA, Reteplase, Streptokinase oder mechanisch mit einem Laser oder Rotablator) und von Mikroinfarkten während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen dienen. Ebenfalls können 10 die vorliegenden Phthalazine I zur Behandlung einer Revascularisation kritisch verengter Koronararterien, zum Beispiel bei der PCTA und Bypass-Operationen, und kritisch verengter peripherer Arterien, zum Beispiel Beinarterien, dienen. Zudem können die Phthalazine I bei der Chemotherapie von Tumoren und deren 15 Metastasierung nützlich sein und zur Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, wie z.B. rheumatischer Arthritis und auch zur Behandlung von Diabetes mellitus dienen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen enthalten neben 25 den üblichen Arzneimittel-hilfstoffen eine therapeutisch wirksame Menge der Verbindungen I.

Für die lokale äußere Anwendung, zum Beispiel in Puder, Salben oder Sprays, können die Wirkstoffe in den üblichen Konzentrationen enthalten sein. In der Regel sind die Wirkstoffe in 30 einer Menge von 0,001 bis 1 Gew.-%, vorzugsweise 0,001 bis 0,1 Gew.-% enthalten.

Bei der inneren Anwendung werden die Präparationen in Einzeldosen 35 verabreicht. In einer Einzeldosis werden pro kg Körpergewicht 0,1 bis 100 mg gegeben. Die Zubereitung können täglich in einer oder mehreren Dosierungen je nach Art und Schwere der Erkrankungen verabreicht werden.

40 Entsprechend der gewünschten Applikationsart enthalten die erfindungsgemäßen Arznei-mittelzubereitungen neben dem Wirkstoff die üblichen Trägerstoffe und Verdünnungsmittel. Für die lokale äußere Anwendung können pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, wie Ethanol, Isopropanol, oxethyliertes Ricinusöl, oxethyliertes 45 Hydriertes Ricinusöl, Polyacrylsäure, Polyethylenglykol, Polyethylenglykostearat, ethoxylierte Fettalkohole, Paraffinöl, Vaseline und Wollfett, verwendet werden. Für die innere Anwendung

eignen sich zum Beispiel Milchzucker, Propylenglykol, Ethanol, Stärke, Talk und Polyvinylpyrrolidon.

Ferner können Antioxidationsmittel wie Tocopherol und butyliertes 5 Hydroxyanisol sowie butyliertes Hydroxytoluol, geschmacksverbessernde Zusatzstoffe, Stabilisierungs-, Emulgier- und Gleitmittel enthalten sein.

Die neben dem Wirkstoff in der Zubereitung enthaltenen Stoffe 10 sowie die bei der Herstellung der pharmazeutischen Zubereitungen verwendeten Stoffe sind toxikologisch unbedenklich und mit dem jeweiligen Wirkstoff verträglich. Die Herstellung der Arzneimittelzubereitungen erfolgt in üblicher Weise, zum Beispiel durch 15 Vermischung des Wirkstoffes mit anderen üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln.

Die Arzneimittelzubereitungen können in verschiedenen Applikationsweisen verbreicht werden, zum Beispiel peroral, parenteral wie intravenös durch Infusion, subkutan, intraperitoneal und 20 topisch. So sind Zubereitungsformen wie Tabletten, Emulsionen, Infusions- und Injektionslösungen, Pasten, Salben, Gele, Cremes, Lotionen, Puder und Sprays möglich.

#### Beispiele

25

##### Beispiel 1

4(N(4-Hydroxyphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 4,4$  (2H), 5,5 (1H), 6,55 (4H), 30 7,75-8,3 (4H), 8,5 (1H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

##### Beispiel 2

4(N(4-N,N-Dimethylsulfamoyl)phenyl-aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

35

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 2,5$  (6H), 4,7 (2H), 6,8 (2H), 7,2 (1H), 7,5 (2H), 7,75-8,3 (4H), und ca. 12,5 (1H) ppm.

##### Beispiel 3

40 4(N(4-Chlorphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):  $\delta = 4,6$  (2H), 6,4 (1H), 6,75 (2H), 7,1 (2H), 7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

45

## Beispiel 4

4(N-Phenyl)-aminomethyl-2H-phthalazin-1-on

1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,6 (2H), 6,3 (1H), 6,2 (1H), 6,8 (2H), 7,1 (2H), 7,9-8,5 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

5

## Beispiel 5

4(N(3-Trifluormethyl-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

10 1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,6 (2H), 6,7 (1H), 6,8 (1), 7,0 (2H), 7,3 (1H), 7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

15

## Beispiel 6

4(N(2-Cyanophenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

15 1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,8 (2H), 6,7 (2H), 7,1 (1H), 7,5-7,8 (2H), 7,95 (1H), 8,1 (1H), 8,4 (2H) und 12,5 (1H) ppm.

20

## Beispiel 7

20 4(N(4-Methoxyphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 3,7 (3H), 4,5 (2H), 5,8 (1H), 6,7 (4H), 7,9-8,3 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

25

## Beispiel 8

4(N(2,4-Dichlorphenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,8 (2H), 6,3 (1H), 7,0 (1H), 7,2 (1H), 7,4 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,3 (2H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

30

## Beispiel 9

4(N(4-Nitrophenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,8 (2H), 6,8 (2H), 7,8-8,4 (7H) und 35 ca. 12,5 (breit) ppm.

## Beispiel 10

4-(N(3-Methylmercapto-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

40 1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 2,4 (3H), 4,6 (2H), 6,3 (1H), 6,4-6,7 (3H), 7,0 (1H), 7,9-8,4 (4H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

45

## Beispiel 11

4(N(2,4-Difluor-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

1H-NMR (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,7 (2H), 6,0 (1H), 7,0 (2H), 7,1 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,3 (2H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

## Beispiel 12

4(N(4-Phenoxy-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

**5**  $^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,6 (2H), 6,2 (1H), 6,8 (2H), 6,9 (3H), 7,1 (1H), 7,4 (2H), 8,0-8,5 (4H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

## Beispiel 13

4(N(4-Trifluormethoxy-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

**10**  $^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,6 (2H), 6,5 (1H), 6,75 (2H), 7,1 (2H), 7,8-8,4 (4H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

## Beispiel 14

4(N(4-Trifluormethyl-phenyl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

**15**

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,7 (2H), 6,8 (2H), 6,95 (1H), 7,4 (2H), 7,8-8,4 (4H) und 12,5 (breit) ppm.

## Beispiel 15

**20** 4(N-Methyl-N-phenyl-aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on x HCl

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 2,7 (1,5H), 3,0 (1,5H), 3,8 (0,5H), 4,0 (0,5H), 4,5 (1H), 4,9 (1H), 6,5-8,3 (9H) und ca. 12,5 (breit) ppm.

**25**

## Beispiel 16

4(S(4-Chlorphenyl)mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,6 (2H), 7,4 (4H), 7,9-8,5 (4H) und ca.

**30** 12,5 (breit) ppm.

## Beispiel 17

4(S(1-Methyl-imidazol-2-yl)mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

**35** Beispiel 18

4(N(5-Methylmercapto-1,3,4-triazol-2-yl)aminomethyl)-2H-phthalazin-1-on

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 2,4 (3H), 4,7 (2H), 7,1 (1H), 7,8-8,3 (4H)

**40** und ca. 12,5 (breit) ppm.

## Beispiel 19

4(S(2-Pyridyl)-mercaptomethyl)-2H-phthalazin-1-on

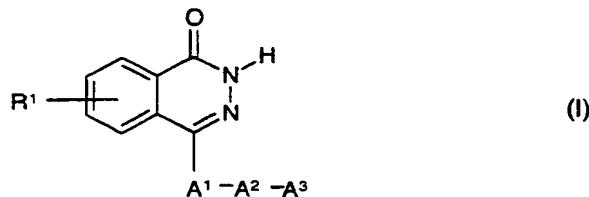
**45**  $^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4,8 (2H), 7,2 (1H), 7,4 (1H), 7,7 (1H), 7,9 (1H), 8,0 (1H), 8,2 (1H), 8,5 (1H) und ca. 12,5 (1H) ppm.

## Patentansprüche

## 1. Verwendung von Verbindungen der Formel I

5

10



worin

15        R<sup>1</sup>    Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und  
 unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, OH, Nitro, CF<sub>3</sub>, CN, NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>,  
 NH-CO-R<sup>13</sup>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, wobei R<sup>11</sup> und R<sup>12</sup> unabhängig  
 voneinander Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl bedeuten und R<sup>13</sup>  
 Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl oder Phenyl  
 bedeuten, und

20

A<sup>1</sup>    einen geradkettigen oder verzweigten C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest und

A<sup>2</sup>    NR<sup>2</sup>, NR<sup>2</sup>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, O und S und

25

R<sup>2</sup>    Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl und

A<sup>3</sup>    einen aromatischen oder heteroaromatischen ein oder zwei-  
 gliedrigen Ring mit je 5 oder 6 Ringatomen und bis zu  
 3 Heteroatomen, ausgewählt aus N, O, S, die noch mit R<sup>4</sup>  
 und einem oder zwei R<sup>3</sup> substituiert sein können, wobei  
 R<sup>3</sup> Wasserstoff, Chlor, Fluor, Brom, Jod, verzweigtes und  
 unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, OH, Nitro, CF<sub>3</sub>, CN, NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>,  
 SO<sub>2</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, SO<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, S-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, O-Ph, O-CF<sub>3</sub>,  
 NH-CO-R<sup>13</sup>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, wobei R<sup>11</sup> und R<sup>12</sup> unabhängig  
 voneinander Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl bedeuten und R<sup>13</sup>  
 Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl oder Phenyl  
 bedeuten kann,

30

35

40

45

R<sup>4</sup>    Wasserstoff, (X)<sub>0,1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-NR<sup>41</sup>R<sup>42</sup>, wobei X = O, S und  
 NR<sup>43</sup> und R<sup>41</sup> und R<sup>42</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Phenyl und ein cyclisches Amin  
 von 3 bis 7 Gliedern sein kann und R<sup>43</sup> Wasserstoff und  
 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sein kann,

sowie ihre tautomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, und deren Prodrugs zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen mit einer erhöhten Aktivität von Poly(ADP-ribose)transferase (PARP).

- 5 2. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 als Inhibitoren von PARP- bzw. PARS-homologen Enzymen.
- 10 3. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 als Inhibitoren von PARP- bzw. PARS-homologen Enzymen, wobei die Verbindungen diese Homologen im Vergleich zum PARP bzw. PARS selbst selektiv hemmen.
- 15 4. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung von solchen neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen, die durch Ischämie, Trauma oder Massenblutungen ausgelöst werden.
6. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung des Schlaganfalls
- 25 7. Verwendung nach Anspruch 4 zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit der Parkinsonsche Krankheit und der Huntington-Krankheit.
- 30 8. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Prophylaxe von Schädigungen durch Ischämien.
- 35 9. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie zum Beispiel Petit mal und tonisch-clonische Anfälle und partiell epileptischen
- 40 10. Anfällen, wie Temporal Lobe, und komplex-partiellen Anfällen.
11. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien und zur Behandlung während und nach Nierentransplantationen.

## 20

11. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien.  
5
12. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Mikroinfarkten wie zum Beispiel während und nach Herzkappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen.  
10
13. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung bei einer Revascularisation kritischer verengter Koronararterien wie zum Beispiel bei PTCA und Bypass-Operationen oder kritisch verengter peripherer Arterien, insbesondere Beinarterien.  
15
14. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung des akuten Myocardinfarktes und von Schädigungen während und nach dessen medikamentöser oder mechanischer Lyse.  
20
15. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Tumoren und deren Metastasierung.  
25
16. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Sepsis und des septischen Schocks.  
30
17. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von immunologischen Krankheiten wie Entzündungen und rheumatische Erkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis.  
35
18. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Diabetes mellitus.  
40
19. Verwendung von Verbindungen, die PARP2 mindestens 5fach stärker inhibieren als PARP1 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die durch eine selektive PARP2-Inhibierung gehindert oder geheilt werden.  
45

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
16. November 2000 (16.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/67734 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61P 9/00. (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03967

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE. AG. AL. AM. AT. AU. AZ. BA. BB. BG. BR. BY. CA. CH. CN. CR. CU. CZ. DE. DK. DM. DZ. EE. ES. FI. GB. GD. GE. GH. GM. HR. HU. ID. IL. IN. IS. JP. KE. KG. KP. KR. KZ. LC. LK. LR. LS. LT. LU. LV. MA. MD. MG. MK. MN. MW. MX. NO. NZ. PL. PT. RO. RU. SD. SE. SG. SI. SK. SL. TJ. TM. TR. TT. TZ. UA. UG. US. UZ. VN. YU. ZA. ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2000 (03.05.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH. GM. KE. LS. MW. SD. SL. SZ. TZ. UG. ZW). eurasisches Patent (AM. AZ. BY. KG. KZ. MD. RU. TJ. TM). europäisches Patent (AT. BE. CH. CY. DE. DK. ES. FI. FR. GB. GR. IE. IT. LU. MC. NL. PT. SE). OAPI-Patent (BF. BJ. CF. CG. CI. CM. GA. GN. GW. ML. MR. NE. SN. TD. TG).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 20. Juni 2002

(30) Angaben zur Priorität: 199 21 567.7 11. Mai 1999 (11.05.1999) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (nur alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBISCH, Wilfried (DE/DE); Häuserstrasse 15, D-69115 Heidelberg (DE). SADOWSKI, Jens (DE/DE); Mainstrasse 2, D-67117 Limburgerhof (DE). KOCK, Michael (DE/DE); Lilengasse 80, D-67105 Schiffenstadt (DE). HÖGER, Thomas (DE/DE); Rathenaustrasse 12, D-68535 Eden- gen-Neckarhausen (DE).

(54) Title: USE OF PHTHALAZINE DERIVATIVES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PHTHALAZINE-DERIVATEN

**WO 00/67734 A3**

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of phthalazine derivatives as inhibitors of the enzyme poly(ADP-ribose)polymerase or PARP (EC 2.4.2.30), and to their use as inhibitors of PARP-homologous enzymes. These phthalazine derivatives also exhibit, in particular, a selective inhibition of the PARP-homologous enzymes. The inventive phthalazine derivatives are used for producing medicaments used in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, stroke, cerebral trauma, epilepsy, damages to the kidney, cardiovascular diseases, tumors, rheumatic diseases, diabetes mellitus, etc.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phthalazin-Derivaten als Inhibitoren des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase oder PARP (EC 2.4.2.30), die Verwendung als Inhibitoren von PARP-homologen Enzymen und insbesondere zeigen diese Phthalazin-Derivate auch eine selektive Hemmung der PARP-homologen Enzyme. In der Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer'sche Krankheit, Parkinsonsche Krankheit, Schlaganfall, Hirntrauma, Epilepsie, nierenschäden, kardiovaskulären Erkrankungen, Tumoren, rheumatische Erkrankungen, Diabetes mellitus etc.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 00/03967

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 A61P9/00 A61P25/00 A61K31/495 A61K31/502

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 45292 A (REDDY RESEARCH FOUNDATION ; REDDY CHEMINOR INC (US)) 15 October 1998 (1998-10-15) abstract page 1, line 3 -page 2, line 13 page 8, line 4 -page 14, line 31; claims 1-5, 9, 10, 15-19 ---	1, 7, 10, 17, 18
X	EP 0 722 936 A (EISAI CO LTD) 24 July 1996 (1996-07-24) abstract page 2 page 14, line 16-30; examples 10, 21 --- -/-	1-6, 8, 10-12, 17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \*Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 2001

Date of mailing of the international search report

06/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/03967

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 11649 A (GUILFORD PHARM INC) 11 March 1999 (1999-03-11) cited in the application abstract page 9, line 6 -page 14, line 33 page 31, line 10 -page 34, line 16 page 67; examples 2-10,15,16 ---	1-19
X, P	WO 00 05218 A (ZAMBON SPA ;GRANCINI GIANCARLO (IT); LEALI GIAN MARCO (IT); MORAZZ) 3 February 2000 (2000-02-03) abstract page 4, line 30 -page 6, line 14 page 16, line 14 -page 17, line 2 ---	1,16,17
X, P	WO 00 05219 A (ZAMBON SPA ;GRANCINI GIANCARLO (IT); MORAZZONI GABRIELE (IT); NAPO) 3 February 2000 (2000-02-03) abstract page 5, line 4 -page 8, line 20 page 15, line 19-29; claims 1-3; examples 6,14,23,25,41 ---	1,16,17
X	BERNARD, A. M. ET AL: "A new and efficient synthesis of phthalazin-1(2H)-ones" SYNTHESIS (1998), (3), 317-320 , XP001010445 abstract; table 2 page 317, column 1, paragraph 1 ---	1,14,16, 18
A	MIYAZAKI, H. ET AL: "The use of stable isotopes in drug metabolism and pharmacokinetics" ADV. PHARMACOL. THER., PROC. INT. CONGR., 8TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 6, 227-33. EDITOR(S): YOSHIDA, HIROSHI: HAGIHARA, YASHIREO;EBASHI, SETSURO. PUBLISHER: PERGAMON, OXFORD, UK. , XP001014487 abstract; figure 4 ---	1
A	US 4 939 140 A (LARSON ERIC R ET AL) 3 July 1990 (1990-07-03) the whole document ---	1-19
A	GB 2 112 389 A (NIPPON KAYAKU KK;BANYU PHARMA CO LTD) 20 July 1983 (1983-07-20) the whole document -----	1-19

Additional matter PCT/ISA/210

Continuation of Field 1.2

Claim No. 19

Relevant Patent Claims Nos. 1-19 refer to an excessively large number of possible compounds of which only a small proportion can be supported by the description under the terms of PCT Article 6 and/or can be regarded as being disclosed in the patent application under the terms of PCT Article 5. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree that a meaningful search appears to be impossible to conduct with respect to the entire scope for which protection is sought.

Relevant Patent Claims Nos. 1-3, 19 refer to a use, which is respectively characterized by a worthwhile peculiarity or quality, namely the inhibition and/or selective inhibition of the enzymes poly(ADP-ribose)polymerase, PARP, PARP1, PARP2, poly(ADP-ribose)transferase PARS or homologs thereof.

The patent claims thus comprise all products, etc., which have this peculiarity or quality, whereas the description of the patent application provides support for only a limited number of such products, etc. under the terms of PCT Article 5. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree that a meaningful search appears to be impossible to conduct with respect to the entire scope for which protection is sought. Nevertheless, the patent claims also lack the clarity required in PCT Article 6, whereby an attempt was made to define the use in terms of the respectively desired outcome. In addition, this absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful search with respect to the entire scope for which protection is sought.

Relevant Patent Claims Nos. 1-3, 19 refer to a use, which is defined using the following parameters:

P1: Treatment of diseases with an increased activity of poly(ADP-ribose)transferase.

P2: Prophylaxis and treatment of diseases, which are hindered or cured by a selective PARP2-inhibition.

The use of these parameters appears, in the given context, to lack clarity under the terms of PCT Article 6. It is impossible to compare the parameters selected by the applicant with that which discloses the prior art. This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful and complete search.

For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as supported and disclosed in the above-mentioned sense, namely at the use of the compounds of Examples Nos. 1-19, which are disclosed in the description, in connection with the diseases specifically contained in the claims.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be

## Additional matter PCT/ISA/210

the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

I. INTERNATIONAL SEARCH REPORT

#### Information on patent family members

Ir. International Application No  
PCT/EP 00/03967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9845292	A	15-10-1998	AU 6966498 EP 0971917	A 30-10-1998 A 19-01-2000
EP 0722936	A	24-07-1996	AU 705229 AU 3191995 FI 961510 KR 189865 NO 961397 NZ 290952 RU 2128175 US 5849741 CA 2173493 CN 1135210 HU 76067 WO 9605176 JP 8225541 US 6218392	B 20-05-1999 A 07-03-1996 A 29-05-1996 B 01-06-1999 A 06-06-1996 A 27-05-1998 C 27-03-1999 A 15-12-1998 A 22-02-1996 A 06-11-1996 A 30-06-1997 A 22-02-1996 A 03-09-1996 B 17-04-2001
WO 9911649	A	11-03-1999	AU 9297898 AU 9298098 AU 9298198 AU 9298698 AU 9299198 AU 9374898 BR 9812428 CN 1278797 EP 1009739 EP 1012145 EP 1012153 NO 20001002 PL 339082 TR 200001557 WO 9911623 WO 9911622 WO 9911644 WO 9911624 WO 9911628 US 6197785 US 6121278 US 6235748 ZA 9808010 ZA 9808011 ZA 9808012 ZA 9808013 ZA 9808015 AU 9298298 BR 9812185 CN 1277613 EP 1019409 NO 20001001 PL 338950 TR 200001279 WO 9911645 ZA 9808016 ZA 9808017	A 22-03-1999 A 22-03-1999 A 22-03-1999 A 22-03-1999 A 22-03-1999 A 22-03-1999 A 26-09-2000 T 03-01-2001 A 21-06-2000 A 28-06-2000 A 28-06-2000 A 27-04-2000 A 04-12-2000 T 22-01-2001 A 11-03-1999 A 11-03-1999 A 11-03-1999 A 11-03-1999 A 11-03-1999 B 06-03-2001 A 19-09-2000 B 22-05-2001 A 03-03-1999 A 03-03-1999 A 03-03-1999 A 03-03-1999 A 03-03-1999 A 03-03-1999 A 22-03-1999 A 18-07-2000 A 20-12-2000 A 19-07-2000 A 05-04-2000 A 04-12-2000 T 23-10-2000 A 11-03-1999 A 03-03-1999 A 03-03-1999
WO 0005218	A	03-02-2000	IT MI981670 AU 5281099	A 21-01-2000 A 14-02-2000

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0005218 A		BR 9911175 A		20-03-2001
		EP 1097142 A		09-05-2001
		NO 20010331 A		20-03-2001
WO 0005219 A	03-02-2000	IT M1981671 A		21-01-2000
		AU 4911699 A		14-02-2000
		EP 1098886 A		16-05-2001
US 4939140 A	03-07-1990	LV 5717 A		20-10-1995
		AU 2733788 A		22-06-1989
		CA 1299181 A		21-04-1992
		CN 1035116 A		30-08-1989
		DK 712388 A		31-07-1989
		EP 0322153 A		28-06-1989
		FI 885886 A		22-06-1989
		HR 931304 A		31-08-1996
		HU 56552 A, B		30-09-1991
		IL 88729 A		23-07-1996
		JP 1211585 A		24-08-1989
		JP 1958310 C		10-08-1995
		JP 6092402 B		16-11-1994
		KR 9100438 B		25-01-1991
		MX 14287 A		01-06-1993
		NZ 227441 A		21-12-1990
		PT 89268 A, B		29-12-1989
		YU 230788 A		31-10-1990
		ZA 8809519 A		29-08-1990
		AT 73801 T		15-04-1992
		AU 574589 B		07-07-1988
		AU 6485886 A		11-06-1987
		BA 98212 B		02-08-1999
		CA 1299178 A		21-04-1992
		CN 86108308 A, B		15-07-1987
		DD 254001 A		10-02-1988
		DE 3684410 A		23-04-1992
		DK 529886 A		08-05-1987
		EG 18144 A		30-08-1992
		EP 0222576 A		20-05-1987
		ES 2032749 T		01-03-1993
		FI 864512 A, B,		08-05-1987
		GR 3004099 T		31-03-1993
		HU 206338 B		28-10-1992
		IE 59315 B		09-02-1994
		IL 80475 A		31-01-1993
		JP 1715495 C		27-11-1992
		JP 4001747 B		14-01-1992
		JP 62114988 A		26-05-1987
		KR 8902758 B		27-07-1989
		NO 168303 B		28-10-1991
		NZ 218192 A		29-08-1989
		PH 26741 A		28-09-1992
		PT 83684 A, B		01-12-1986
		SU 1551246 A		15-03-1990
		YU 189086 A		30-06-1988
		ZA 8608450 A		29-06-1988
GB 2112389 A	20-07-1983	JP 58116471 A		11-07-1983
		BE 895500 A		15-04-1983

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. International Application No

PCT/EP 00/03967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2112389 A		DE 3248431 A	14-07-1983
		DK 572782 A	30-06-1983
		ES 519091 D	16-05-1984
		ES 8404786 A	16-08-1984
		FR 2518991 A	01-07-1983
		NL 8205038 A	18-07-1983
		SE 8207194 A	30-06-1983

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03967

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 A61P9/00 A61P25/00 A61K31/495 A61K31/502

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 45292 A (REDDY RESEARCH FOUNDATION ;REDDY CHEMINOR INC (US)) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Zusammenfassung Seite 1, Zeile 3 -Seite 2, Zeile 13 Seite 8, Zeile 4 -Seite 14, Zeile 31; Ansprüche 1-5,9,10,15-19 ---	1,7,10, 17,18
X	EP 0 722 936 A (EISAI CO LTD) 24. Juli 1996 (1996-07-24) Zusammenfassung Seite 2 Seite 14, Zeile 16-30; Beispiele 10,21 --- -/-	1-6,8, 10-12,17

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiteilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
26. Juli 2001	06/08/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter A. Jakobs

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03967

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 11649 A (GUILFORD PHARM INC) 11. März 1999 (1999-03-11) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 9, Zeile 6 -Seite 14, Zeile 33 Seite 31, Zeile 10 -Seite 34, Zeile 16 Seite 67; Beispiele 2-10,15,16 ---	1-19
X, P	WO 00 05218 A (ZAMBON SPA ;GRANCINI GIANCARLO (IT); LEALI GIAN MARCO (IT); MORAZZI) 3. Februar 2000 (2000-02-03) Zusammenfassung Seite 4, Zeile 30 -Seite 6, Zeile 14 Seite 16, Zeile 14 -Seite 17, Zeile 2 ---	1,16,17
X, P	WO 00 05219 A (ZAMBON SPA ;GRANCINI GIANCARLO (IT); MORAZZONI GABRIELE (IT); NAPO) 3. Februar 2000 (2000-02-03) Zusammenfassung Seite 5, Zeile 4 -Seite 8, Zeile 20 Seite 15, Zeile 19-29; Ansprüche 1-3; Beispiele 6,14,23,25,41 ---	1,16,17
X	BERNARD, A. M. ET AL: "A new and efficient synthesis of phthalazin-1(2H)-ones" SYNTHESIS (1998), (3), 317-320 , XP001010445 Zusammenfassung; Tabelle 2 Seite 317, Spalte 1, Absatz 1 ---	1,14,16, 18
A	MIYAZAKI, H. ET AL: "The use of stable isotopes in drug metabolism and pharmacokinetics" ADV. PHARMACOL. THER., PROC. INT. CONGR., 8TH (1982), MEETING DATE 1981, VOLUME 6, 227-33. EDITOR(S): YOSHIDA, HIROSHI; HAGIHARA, YASHIREO; EBASHI, SETSURO. PUBLISHER: PERGAMON, OXFORD, UK. , XP001014487 Zusammenfassung; Abbildung 4 ---	1
A	US 4 939 140 A (LARSON ERIC R ET AL) 3. Juli 1990 (1990-07-03) das ganze Dokument ---	1-19
A	GB 2 112 389 A (NIPPON KAYAKU KK;BANYU PHARMA CO LTD) 20. Juli 1983 (1983-07-20) das ganze Dokument -----	1-19

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld I.2	
Ansprüche Nr.: 19	
<p>Die geltenden Patentansprüche 1-19 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.</p>	
<p>Die geltenden Patentansprüche 1-3,19 beziehen sich auf eine Verwendung, die jeweils durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich Inhibierung und/oder selektive Hemmung der Enzyme Poly(ADP-ribose)polymerase, PARP, PARP1, PARP2, Poly(ADP-ribose)transferase PARS bzw. deren homologe charakterisiert ist.</p>	
<p>Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verwendung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.</p>	
<p>Die geltenden Patentansprüche 1-3,19 sind auf eine Verwendung die mittels folgender Parameter definiert wird, zu beziehen:</p> <p>P1: Behandlung von Erkrankungen mit einer erhöhten Aktivität von Poly(ADP-ribose)transferase.</p> <p>P2: Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen die durch eine selektive PARP2-inhibierung gehindert oder geheilt werden.</p> <p>Die Verwendung dieser Parameter muss im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Es ist unmöglich, die vom Anmelder gewählten Parameter mit dem zu vergleichen, was der Stand der Technik hierzu offenbart. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht.</p>	
<p>Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Verwendung der Verbindungen der Beispiele 1-19 die in der Beschreibung offenbart sind im Zusammenhang mit den spezifisch in den Ansprüchen enthaltenen Erkrankungen.</p>	
<p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer</p>	

WEITERE ANGABEN	PCT/SA/ 210
internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03967

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9845292	A	15-10-1998		AU 6966498 A		30-10-1998
				EP 0971917 A		19-01-2000
EP 0722936	A	24-07-1996		AU 705229 B		20-05-1999
				AU 3191995 A		07-03-1996
				FI 961510 A		29-05-1996
				KR 189865 B		01-06-1999
				NO 961397 A		06-06-1996
				NZ 290952 A		27-05-1998
				RU 2128175 C		27-03-1999
				US 5849741 A		15-12-1998
				CA 2173493 A		22-02-1996
				CN 1135210 A		06-11-1996
				HU 76067 A		30-06-1997
				WO 9605176 A		22-02-1996
				JP 8225541 A		03-09-1996
				US 6218392 B		17-04-2001
WO 9911649	A	11-03-1999		AU 9297898 A		22-03-1999
				AU 9298098 A		22-03-1999
				AU 9298198 A		22-03-1999
				AU 9298698 A		22-03-1999
				AU 9299198 A		22-03-1999
				AU 9374898 A		22-03-1999
				BR 9812428 A		26-09-2000
				CN 1278797 T		03-01-2001
				EP 1009739 A		21-06-2000
				EP 1012145 A		28-06-2000
				EP 1012153 A		28-06-2000
				NO 20001002 A		27-04-2000
				PL 339082 A		04-12-2000
				TR 200001557 T		22-01-2001
				WO 9911623 A		11-03-1999
				WO 9911622 A		11-03-1999
				WO 9911644 A		11-03-1999
				WO 9911624 A		11-03-1999
				WO 9911628 A		11-03-1999
				US 6197785 B		06-03-2001
				US 6121278 A		19-09-2000
				US 6235748 B		22-05-2001
				ZA 9808010 A		03-03-1999
				ZA 9808011 A		03-03-1999
				ZA 9808012 A		03-03-1999
				ZA 9808013 A		03-03-1999
				ZA 9808015 A		03-03-1999
				AU 9298298 A		22-03-1999
				BR 9812185 A		18-07-2000
				CN 1277613 T		20-12-2000
				EP 1019409 A		19-07-2000
				NO 20001001 A		05-04-2000
				PL 338950 A		04-12-2000
				TR 200001279 T		23-10-2000
				WO 9911645 A		11-03-1999
				ZA 9808016 A		03-03-1999
				ZA 9808017 A		03-03-1999
WO 0005218	A	03-02-2000		IT MI981670 A		21-01-2000
				AU 5281099 A		14-02-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03967

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0005218 A		BR 9911175 A EP 1097142 A NO 20010331 A	20-03-2001 09-05-2001 20-03-2001
WO 0005219 A	03-02-2000	IT MI981671 A AU 4911699 A EP 1098886 A	21-01-2000 14-02-2000 16-05-2001
US 4939140 A	03-07-1990	LV 5717 A AU 2733788 A CA 1299181 A CN 1035116 A DK 712388 A EP 0322153 A FI 885886 A HR 931304 A HU 56552 A, B IL 88729 A JP 1211585 A JP 1958310 C JP 6092402 B KR 9100438 B MX 14287 A NZ 227441 A PT 89268 A, B YU 230788 A ZA 8809519 A	20-10-1995 22-06-1989 21-04-1992 30-08-1989 31-07-1989 28-06-1989 22-06-1989 31-08-1996 30-09-1991 23-07-1996 24-08-1989 10-08-1995 16-11-1994 25-01-1991 01-06-1993 21-12-1990 29-12-1989 31-10-1990 29-08-1990 15-04-1992 07-07-1988 11-06-1987 02-08-1999 21-04-1992 15-07-1987 10-02-1988 23-04-1992 08-05-1987 30-08-1992 20-05-1987 01-03-1993 08-05-1987 31-03-1993 28-10-1992 09-02-1994 31-01-1993 27-11-1992 14-01-1992 26-05-1987 27-07-1989 28-10-1991 29-08-1989 28-09-1992 01-12-1986 15-03-1990 30-06-1988 29-06-1988
GB 2112389 A	20-07-1983	JP 58116471 A BE 895500 A	11-07-1983 15-04-1983

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03967

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2112389 A		DE 3248431 A	14-07-1983
		DK 572782 A	30-06-1983
		ES 519091 D	16-05-1984
		ES 8404786 A	16-08-1984
		FR 2518991 A	01-07-1983
		NL 8205038 A	18-07-1983
		SE 8207194 A	30-06-1983

